

УДК 577.21

VPg ВИРУСА PVY И КЭП-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ФАКТОРЫ СЕМЕЙСТВА eIF4E КАРТОФЕЛЯ: ИЗБИРАТЕЛЬНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ И ЕГО ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ

© 2021 М.В. Лебедева^{1*}, Е.Ю. Никонова², А.А. Терентьев^{3,4,5},
В.В. Таранов¹, А.В. Бабаков¹, О.С. Никонов²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии
Российской академии наук, 127550 Москва, Россия; электронная почта: marilistik@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук,
142290 Пущино, Московская область, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химической физики
Российской академии наук, 142432 Черноголовка, Московская область, Россия

⁴ Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского государственного
областного университета, 141014 Мытищи, Московская область, Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет фундаментальной физико-химической инженерии, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.05.2021

После доработки 30.05.2021

Принята к публикации 31.05.2021

Вирус картофеля Y (PVY) является одним из наиболее распространенных и вредоносных растительных вирусов. Трансляция вирусной РНК начинается с взаимодействия белка VPg, ковалентно связанного с вирусной РНК и растительными кЭп-связывающими факторами инициации трансляции семейства eIF4E. С нарушением этого взаимодействия связан один из основных механизмов устойчивости растений к вирусу картофеля Y. В геноме картофеля (*Solanum tuberosum* L.) мультигеновое семейство факторов eIF4E представлено тремя генами – *eIF4E1*, *eIF4E2* и *eIF(iso)4E*. До настоящего времени было неизвестно, с какими именно факторами мультигеновое семейство и каким образом связывается вирусный белок. В представленной работе показано, что наиболее распространённый вариант VPg штамма NTN взаимодействует с изоформами картофеля eIF4E1 и eIF4E2, но не взаимодействует с eIF(iso)4E. Были сконструированы модели белков картофеля eIF4E1 и eIF4E2 и VPg вируса Y, на основании которых с использованием данных о природном полиморфизме аминокислотных последовательностей белка VPg было выдвинуто предположение о ключевой роли остатка R104 в узнавании кЭп-связывающих факторов картофеля. Получены мутантные формы белка VPg с заменами в этом положении и проверена их способность связываться с eIF4E картофеля. С использованием полученных экспериментальных и известных структурных данных построена теоретическая модель комплекса VPg с eIF4E2. Предложенная модель существенно отличается от известных ранее моделей комплексов VPg вируса Y с eIF4E и хорошо соответствует имеющимся биохимическим данным.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: eIF4E, вирус Y картофеля, VPg, инициация трансляции.

DOI: 10.31857/S0320972521090086

ВВЕДЕНИЕ

Вирус картофеля Y (PVY) входит в топ 10 самых экономически значимых растительных вирусов [1, 2]. Он распространён по всему миру и имеет широкий круг хозяев, включающий в себя, кроме картофеля, такие экономически важные культуры, как табак, томат и перец. Картофель подвержен воздействию вируса в наибольшей степени, это обусловлено, прежде всего, вегетативным способом его размножения, что приводит к накоплению вирусов в поколениях.

Как и у всех потивирусов, геном PVY состоит из полиаденилированной одноцепочечной (+) РНК, к 5'-концу которой ковалентно присоединён белок VPg (viral genome-linked protein). Одной из ключевых функций этого белка является взаимодействие с кЭп-связывающими факторами инициации трансляции семейства eIF4E растения-хозяина для начала синтеза вирусных белков. Взаимодействие VPg и eIF4E является необходимым условием развития вирусной инфекции [3]. Показано, что существуют варианты факторов eIF4E, которые способны связывать кЭп-структуру клеточных мРНК, но при этом не взаимодействуют с VPg вируса, причём для нарушения взаимодействия с вирусным белком за-

* Адресат для корреспонденции.

частую достаточно единичных аминокислотных замен в инициаторном факторе [4–6]. Если растение содержит только такие факторы инициации трансляции, то оно будет устойчивым к вирусу. Такая устойчивость является рецессивной, так как присутствие хотя бы одной формы фактора, поддерживающей трансляцию вируса, делает её неэффективной.

У многих растений семейства Solanaceae eIF4E представлен мультисемейством белков, включающим в себя несколько факторов: eIF4E1, eIF4E2, eIF(iso)4E [6–10]. Эти белки рассматриваются как изоформы, любая из которых может быть использована для инициации трансляции как мРНК клетки-хозяина, так и мРНК потивирусов. Показано, например, что при заражении перца (*Capsicum annuum* L.) вирусом картофеля Y инициация трансляции вирусной мРНК происходит при помощи только eIF4E1. Наличие в перце мутантных вариантов eIF4E1 с единичными аминокислотными заменами, нарушающими взаимодействие с VPg, оказалось достаточным для возникновения долговременной полевой устойчивости сортов перца к PVY [11]. В то же время для томата (*Solanum lycopersicum* L.) устойчивость к PVY достигалась только нокаутом генов, кодирующих оба фактора, eIF4E1 и eIF4E2 [12, 13]. Устойчивость может возникнуть и за счёт полного отсутствия одной изоформы eIF4E, как, например, в случае культурного табака (*Nicotiana tabacum* L.), у которого встречаются устойчивые к PVY сорта, не содержащие eIF4E1 [14]. Однако вирус Y может преодолевать устойчивость за счёт возникновения так называемых «resistance-breaking» мутаций в VPg. Эти мутации позволяют VPg либо восстанавливать взаимодействие с мутировавшим eIF4E1, либо начинать использовать другие белки этого мультисемейства [5, 15–17]. На настоящий момент для картофеля природная eIF4E-опосредованная устойчивость не обнаружена [18]. Исследование полиморфизма фактора eIF4E1 среди диких видов картофеля [19] позволило выявить лишь один вариант этого белка, неспособный взаимодействовать с VPg вируса Y. Сверхэкспрессия такого фактора в растениях замедляла развитие вирусной инфекции, но тем не менее была недостаточна для её подавления. Однако в нескольких работах была показана принципиальная возможность реализации eIF4E-опосредованной устойчивости для картофеля. Так, сверхэкспрессия в растениях картофеля аллелей перца *pvr1*² [10] и томата *pot1* [20], обеспечивающих устойчивость этих растений к PVY, приводила к возникновению устойчивости и у картофеля.

Обычно аллели, обеспечивающие устойчивость, отличаются от остальных небольшим ко-

личеством замен [3, 21, 22], что делает возможным использование современных методов геномного редактирования для получения устойчивых картофеля, несущих только «устойчивые» факторы eIF4E. Однако до сих пор неизвестно, какие факторы семейства eIF4E картофеля могут рекрутировать PVY и какие именно замены в белках eIF4E картофеля нарушат взаимодействие с VPg, не влияя при этом на взаимодействие фактора с кэп-структурой мРНК самого растения. Кристаллическая структура комплекса VPg и eIF4E картофеля, с помощью которой можно было бы предсказать такие замены в факторе, на данный момент отсутствует. Также отсутствуют структуры комплексов представителей факторов этого мультисемейства и белка VPg из каких-либо потивирусов. Одна из причин этого может заключаться в слабой упорядоченности вирусного белка. Долгое время считалось, что VPg не имеет упорядоченной структуры [23], поэтому может взаимодействовать с большим количеством вирусных и растительных белков [24]. Однако недавно было показано [25, 26], что VPg имеет неупорядоченные N- и C-концы, тогда как центральная его часть имеет глобулярную структуру. Более того, имеющиеся данные указывают на то, что узнавание происходит за счёт взаимодействия eIF4E именно со структурированной частью VPg. Кроме того, в ряде работ [25–29] было показано, что для узнавания и связывания eIF4E VPg использует механизм, аналогичный механизму связывания фактора с кэпированным 5'-концом мРНК, а сайты узнавания кэп-структуры и белка VPg на последовательности eIF4E перекрываются. Экспериментальные структуры факторов инициации трансляции мультисемейства eIF4E картофеля в настоящее время также отсутствуют. Имеются только две теоретические модели [25, 26], построенные на основе экспериментальных структур фактора инициации трансляции eIF4E человека и VPg PVY, которые тем не менее не позволяют достаточно полно интерпретировать все имеющиеся биохимические данные.

Целью данной работы являлось установить, с какими изоформами eIF4E картофеля взаимодействует VPg наиболее агрессивного и распространённого штамма вируса Y NTN, выявить критичные для этого взаимодействия аминокислотные остатки и дать структурную интерпретацию полученных данных, позволяющую лучше понять его механизм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный и вирусный материал. Образец вируса Y был получен с растения картофеля с

симптомами заражения вирусом штамма NTN с полевой станции Тимирязевской академии от М.В. Поляковой. Растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта «Жуковский ранний» выращивали в теплице при 25 °С.

Последовательности VPg вируса Y разных штаммов для анализа консервативности этого белка были взяты из базы данных NCBI, как отдельные VPg, так и извлечённые из полных геномов PVY. Анализ полиморфизма аминокислотных последовательностей VPg проводился в программе Unipro UGENE [30].

Секвенирование генов факторов мультисемейства eIF4E картофеля и VPg PVY. Тотальную РНК выделяли из листьев картофеля с помощью реагента ExtractRNA («Евроген», Россия), согласно инструкции производителя. кДНК была получена с помощью набора для синтеза кДНК Mint («Евроген») с олиго(dT)-праймера, согласно инструкции производителя. Амплификацию кодирующей части генов eIF4E картофеля и VPg осуществляли с помощью праймеров («Синтол», Россия), последовательности которых приведены в таблице в Приложении. Полученные ПЦР-продукты клонировали в вектор pAL2-T («Евроген», Россия), согласно инструкции производителя. Для того чтобы выявить все аллели eIF4E картофеля и все варианты VPg было отсеквенировано в ЦКП «Биотехнология» (ВНИИСБ) по 15 клонов для каждого фактора и 5 клонов – для VPg.

Комплементация факторов eIF4E. Функциональность факторов eIF4E картофеля оценивали по их способности поддерживать рост дрожжей штамма Jo55 [cdc33-D LEU2 leu2 ura3 his3 trp1 ade2 (YCr33supex-h4E URA3)] [31], любезно предоставленного Dr. J.-L. Gallois, INRA. Мутация cdc33-D обозначает инактивированный эндогенный фактор eIF4E. Этот штамм способен расти за счёт наличия плазмиды YCr33supex-h4E URA3, несущей ген eIF4E человека, экспрессия которого регулируется промотором, который активируется галактозой и подавляется в присутствии глюкозы.

Кодирующие области генов факторов eIF4E (eIF4E1 – MT828879, eIF4E2 – MT828873, eIF(iso)4E – MT828876) картофеля были клонированы в созданный нами вектор pJo55 (<https://www.addgene.org/159623/>) под контроль глюкозо-зависимого промотора. Дрожжи штамма Jo55 трансформировали полученными векторами в присутствии PEG/LiAc [32]. Для анализа функциональности факторов дрожжи выращивали на среде Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids («Sigma-Aldrich», США) с добавлением всех аминокислот, кроме гистидина, содержащей 2% глюкозы при 20 °С в течение недели.

В качестве положительного контроля использовали плазмиду pJo55, несущую ген фактора eIF4E1 *S. annuum* L., а в качестве отрицательного – пустую плазмиду pJo55.

Анализ взаимодействия белков eIF4E картофеля и VPg PVY. Для анализа взаимодействия белков использовали систему дрожжевого дугибридного анализа Matchmaker GAL4 («Clontech», США). Гены изоформ факторов eIF4E картофеля были клонированы в плазмиду pGADT7 («Clontech», США) по сайтам рестрикции NdeI/SacI либо NdeI/Sall, а гены всех использованных в работе вариантов VPg – в плазмиду pGBKT7 («Clontech») по сайтам рестрикции Sall/PstI.

Точечные замены S101G, R104K, R104T, R104M, R104E в VPg вносили с помощью метода сайт-направленного мутагенеза с перекрывающимися праймерами («Синтол»), которые приведены в таблице в Приложении.

Дрожжи штамма PJ69-4A (*MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ Met2::GAL7-lacZ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2*) трансформировали полученными плазмидами в присутствии PEG/LiAc [32]. После трансформации дрожжи высевали на селективную среду («Clontech»), не содержащую лейцин и триптофан (-LW) и инкубировали при 30 °С. Выросшие колонии дрожжей проверяли на наличие плазмид с помощью ПЦР. Проверенные колонии пересевали на жидкую LW-среду и выращивали при 30 °С до оптической плотности 2 (OD₆₀₀). Далее дрожжи промывали стерильной деионизированной водой и раскапывали в чашках разведениях на чашки с селективными средами: LWN + 1мМ 3АТ (среда без лейцина, триптофана и гистидина, с добавлением 1 мМ 3-амино-1,2,4-триазола, подавляющего автоактивацию репортерного гена *HIS3*) и LWNH (среда без лейцина, триптофана, аденина и гистидина). В качестве отрицательного контроля использовали дрожжи, трансформированные «пустыми» плазмидами pGADT7 и pGBKT7. В качестве положительного контроля использовали комбинацию плазмид, несущих гены фактора инициации трансляции eIF4E1 *Nicotiana tabacum* L. и VPg-NTN. Чашки инкубировали при 20 °С в течение недели.

Для вариантов, которые показали факт качественного взаимодействия на твёрдых средах, силу взаимодействия белков оценивали количественно с помощью набора Gal-Screen System Galacton-Plus («Applied Biosystems», США) по протоколу для дрожжевых клеток. Этот подход основан на оценке способности фермента β-галактозидазы расщеплять субстрат (Gal-Screen Substrate, «Applied Biosystems»), что приводит к

его люминесценции. При этом количество β -галактозидазы в клетках дрожжей коррелирует с силой взаимодействия белков интереса [33].

Клетки, несущие плазмиды, наращивали при 20 °С в течение ночи. Далее измеряли оптическую плотность образцов и разводили их до концентрации ~75 000 клеток в 100 мкл. После этого добавляли подготовленный субстрат и измеряли изменение люминесценции в течение 90 мин с интервалом в минуту с помощью планшетного люцинометра Alpha Fusion («Perkin Elmer», США). Время измерения одного образца составляло 0,6 с. Каждый образец анализировали в четырёх повторах.

Вестерн-блот-анализ. Плазида pGADT7, в которую клонировали гены факторов eIF4E картофеля, включает в себя нуклеотидную последовательность эпитопа HA, а плазида pGBKT7, в которую клонировали гены VPg, — C-MYC. Таким образом, возможна проверка наличия и количества белков, взаимодействие которых анализируется, с помощью иммуноблоттинга с коммерческими антителами.

Для выделения белков образцы дрожжей, использованные в двугибридном анализе, выращивали при 20 °С до оптической плотности 1,5 (OD₆₀₀). Далее клетки осаждали, удаляли среду, добавляли равный объём 2× буфера Laemmli [34] и кипятили на водяной бане в течение 10 мин. С полученными образцами белков проводили ПААГ-электрофорез (концентрация разделяющего геля — 10%) в присутствии SDS по методу Laemmli [34] в камере Mini Protean II («BioRad», США). Белки перенесли на нейлоновую мембрану Hybond-C Extra («Amersham Bioscience», Великобритания) с помощью камеры Mini Trans-Blot Cell («BioRad»). После переноса мембрану блокировали в 5%-ном растворе БСА в буфере TBST (100 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20) в течение часа при комнатной температуре.

Для выявления факторов eIF4E картофеля использовали первичные поликлональные антитела кролика на эпитоп HA (1 : 5000, «Abcam», Великобритания). Для детекции выявления белков VPg использовали первичные моноклональные антитела мыши на эпитоп C-MYC (1 : 500, «SCI-STORE», Россия). Для детекции выявления референсного белка тубулина использовали первичные моноклональные антитела мыши (1 : 5000, «Cloud-Clone», США).

В качестве вторичных антител использовали поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов кролика или мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 5000, «R&D Systems», США).

Антитела, связавшиеся с мембраной, детектировали с помощью смеси хемилюминесцентного субстрата, содержащего 100 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 1,25 мМ люминол, 6,8 мкМ р-кумаровую кислоту и 0,01% H₂O₂. Мембраны инкубировали в смеси в течение 1 мин при комнатной температуре и сканировали на приборе C-DiGit Blot Scanner («Li-Cor», США).

Конструирование модели eIF4E картофеля. Для получения стартовых моделей факторов инициации трансляции картофеля eIF4E1 и eIF4E2 был использован метод гомологичного моделирования, представленный на сервере swiss model [35]. Для более точной оценки возможной вариативности структуры были построены модели с использованием в качестве шаблона структур белков из различных организмов, а именно из дыни (*Cucumis melo*) (PDB-коды использованных структур: 5me5, 5me6, 5me7), пшеницы (*Triticum aestivum*) (PDB-коды использованных структур: 2idv, 2idr), человека (*Homo sapiens*) (PDB-коды использованных структур: 2w97, 3am7, 5ehc, 4tpw, 5t46), дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) (PDB-код использованной структуры: 4axg), дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) (PDB-код использованной структуры: 1rf8). Сравнительный анализ и ручную правку моделей проводили в программе молекулярной графики COOT [36]. Множественные перекрестные наложения структур и их фрагментов с использованием метода наименьших квадратов и алгоритма SSM [37] показали, что пространственные структуры на уровне α -атомов во всех моделях, полученных на базе разных шаблонов, оказались очень похожи, что говорит о высокой структурной консервативности фактора eIF4E.

Аминокислотная последовательность факторов инициации трансляции картофеля наиболее близка к последовательности фактора дыни (81,3% идентичности для упорядоченной C-концевой части, содержащей 176 а.о.). В PDB банке eIF4E фактор дыни представлен тремя структурами, одна из которых (PDB id 5me6) содержит аналог кэп мРНК. Каждая структура представлена четырьмя молекулами в асимметричной части элементарной ячейки кристалла. Ни одна молекула не является абсолютно полной, однако они дополняют друг друга и использование их всех позволяет построить полную модель eIF4E2 картофеля.

В структурах фактора из дыни хуже всего представлена петля β 1- β 2, которая полностью видна только в молекуле C. В структуре eIF4E1 из пшеницы (76,0% идентичности по последовательности с eIF4E2 картофеля) эта петля представлена полностью, однако конформация

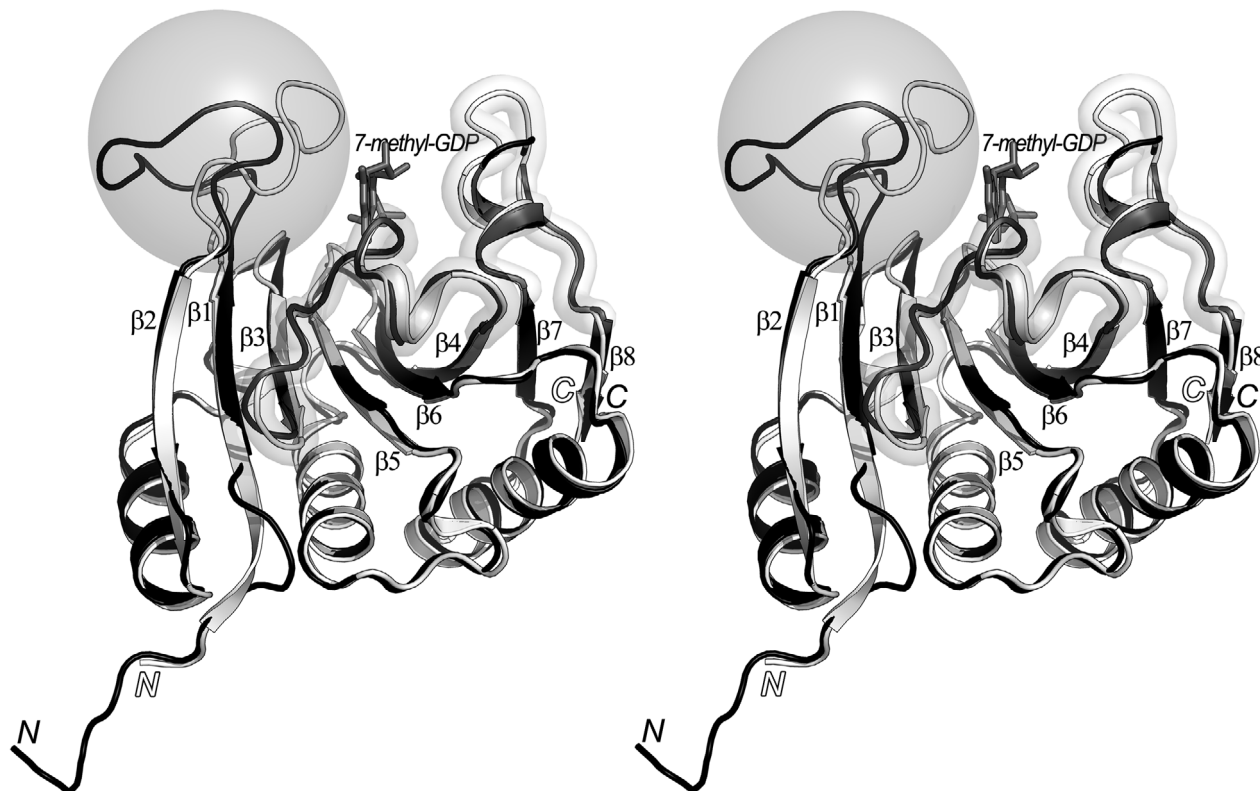


Рис. 1. Стереорезультат наложения структур фактора инициации трансляции eIF4E, соответствующих его открытой и закрытой конформациям

её значительно изменена в результате взаимодействия с кэпом. Структуры из дыни и пшеницы представляют два состояния молекулы eIF4E: открытое и закрытое. В свободном состоянии фактор находится в открытом состоянии, в связанном с лигандом — в закрытом (рис. 1).

Открытая конформация представлена структурой фактора из дыни (PDB ID 5ME6 [38], молекула С, выделено черным цветом), закрытая конформация представлена структурой фактора в комплексе с аналогом кэп (7-метил-ГДФ, показан серым) из пшеницы (PDB ID 2IDV [39], показана белым цветом). Положение петли $\beta 1$ – $\beta 2$, определяющее закрытую и открытую конформацию выделено полупрозрачной сферой. Положение шпилек $\beta 3$ – $\beta 4$ и $\beta 7$ – $\beta 8$ выделено полупрозрачной окантовкой. β -Тяжи промаркированы.

Участок $\beta 7$ – $\beta 8$ не принимает участия в связывании кэпа. Он виден полностью почти во всех представленных структурах, за исключением молекулы С в структурах из дыни. В исходной форме модели eIF4E2 из картофеля конформация этого участка соответствует молекуле А структуры 5me6. Конформация остальных частей молекулы eIF4E практически идентична

в структурах из дыни и пшеницы и в модели из картофеля VPg–eIF4E. Для проверки стабильности полученной модели, а также для выявления её конформационной подвижности она была подвергнута молекулярно-динамическому моделированию и уточнению. Наложение полученной модели на структуру фактора инициации трансляции eIF4E из дыни дает среднее квадратичное отклонение 0,722 Å для 136 C α -атомов.

Конструирование модели комплекса VPg–eIF4E–VPg из картофеля. В основе нашей модели VPg в составе комплекса лежит экспериментальная структура этого белка, полученная методом ЯМР (PDB ID: bnfw). Полученная модель была укорочена с N- и C-концов и содержала а.о. 72–183. Таким образом, мы убрали из рассмотрения неструктурированные участки. Построение модели комплекса VPg–eIF4E производили вручную, исходя из предположения, что R104 VPg узнает остатки eIF4E, аналогичные тем, что узнает кэп, и завязывает аналогичные водородные связи. Конформация боковой цепи аргинина выбиралась так, чтобы избежать пересечений и близких контактов между молекулами. Построение модели осуществлялось

методами молекулярного моделирования с помощью программы Coot [36]. Исходная модель была подвергнута процедурам молекулярной динамики и уточнена на временном интервале 200 нс.

Уточнение моделей методами молекулярной динамики. Молекулярно-динамическое моделирование структур белка eIF4E2 и его комплекса с VPg PVY проведено в программном пакете Gromacs 2020.4 [40] с использованием силового поля Charmm36 [41]. Кислые остатки были депротонированы и несли заряд -1 , основные – протонированы и несли заряд $+1$. Водное окружение моделировалось с использованием трёхточечной модели воды CHARMM TIP3P (TIP3P). Общий заряд системы был нейтрализован за счёт добавления ионов Na^+ и Cl^- .

Минимизация энергии модели проводилась методом быстрого спуска. Система была уравновешена с достижением постоянной температуры 310 К и постоянного давления 1 бар, после чего была рассчитана молекулярно-динамическая траектория во временном интервале длиной 200 нс при данных постоянном давлении и температуре с шагом 2 фс. Для расчёта дальнедействующих электростатических взаимодействий применен алгоритм PME (Particle Mesh Ewald) [42]. Температура и давление контролировались с помощью масштабирования скоростей со стохастическим членом (модифицированный термостат Берендсена) и алгоритмом Парринелло–Рамана (баростат Парринел-

ло–Рамана) соответственно. Координаты сохранялись каждые 10 пс. Анализ молекулярно-динамических траекторий выполнен в программах Gromacs и Pymol (<https://www.pymol.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация и исследование функциональности факторов eIF4E картофеля. Известно, что в листьях картофеля экспрессируются гены трёх факторов инициации трансляции семейства eIF4E – eIF4E1, eIF4E2 (eIF4E1-like) и eIF(iso)4E (eIF4E2-like) [10]. Секвенирование кДНК изоформ eIF4E в сорте «Жуковский ранний» (номера последовательностей в базе данных NCBI, GenBank: eIF4E1 (MT828879, MT828880), eIF4E2 (MT828873, MT828874, MT828875), eIF(iso)4E (MT828876, MT828877, MT828878)) показало их высокую консервативность (выравнивание транслированных аминокислотных последовательностей показано на рис. S1–S3 в Приложении). Способность этих изоформ eIF4E иницировать трансляцию была проверена комплементацией роста дрожжей штамма Jo55 [31, 43]. Такая система позволяет *in vivo* оценить функциональность гена *eIF4E*, кодирующая область которого находится в плазмиде под контролем глюкозо-зависимого промотора. Комплементарный анализ показал, что все три изоформы eIF4E картофеля функционально активны (рис. 2).

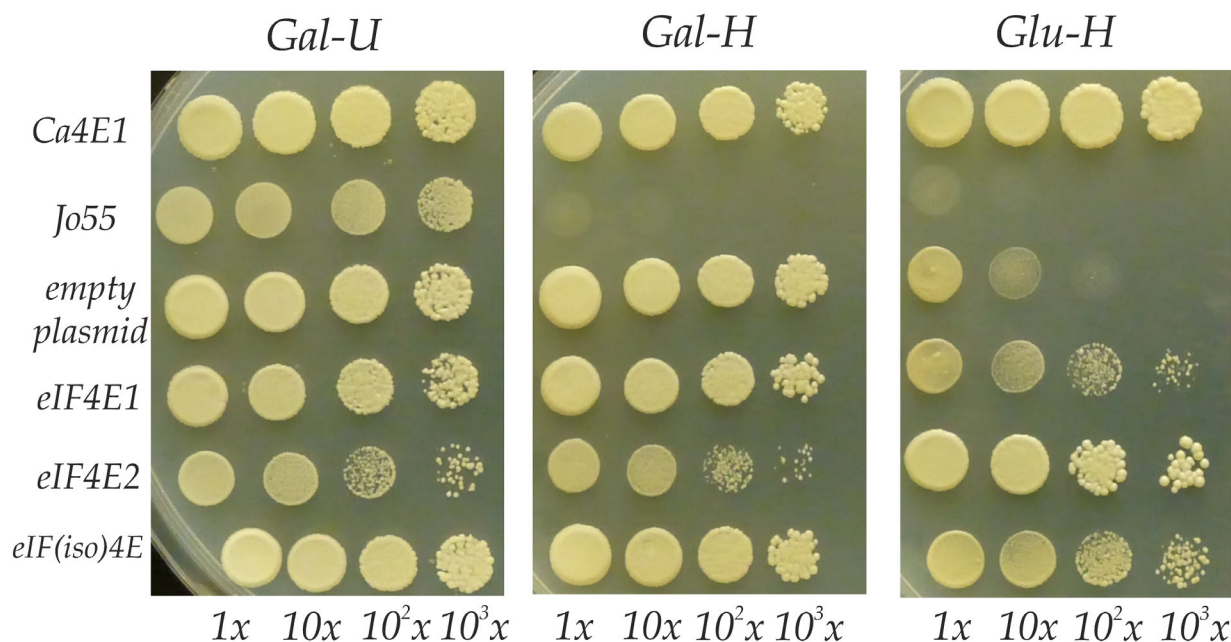


Рис. 2. Комплементация роста дрожжей штамма Jo55 за счёт экспрессии генов факторов инициации трансляции семейства eIF4E картофеля

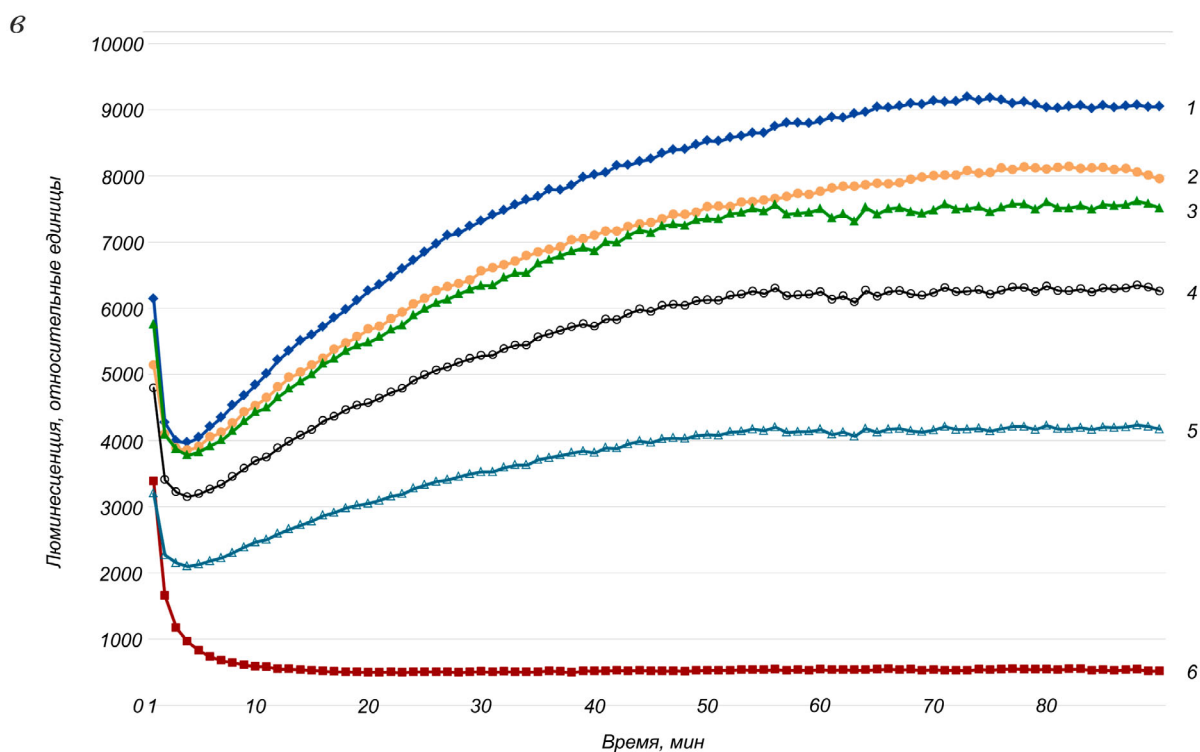
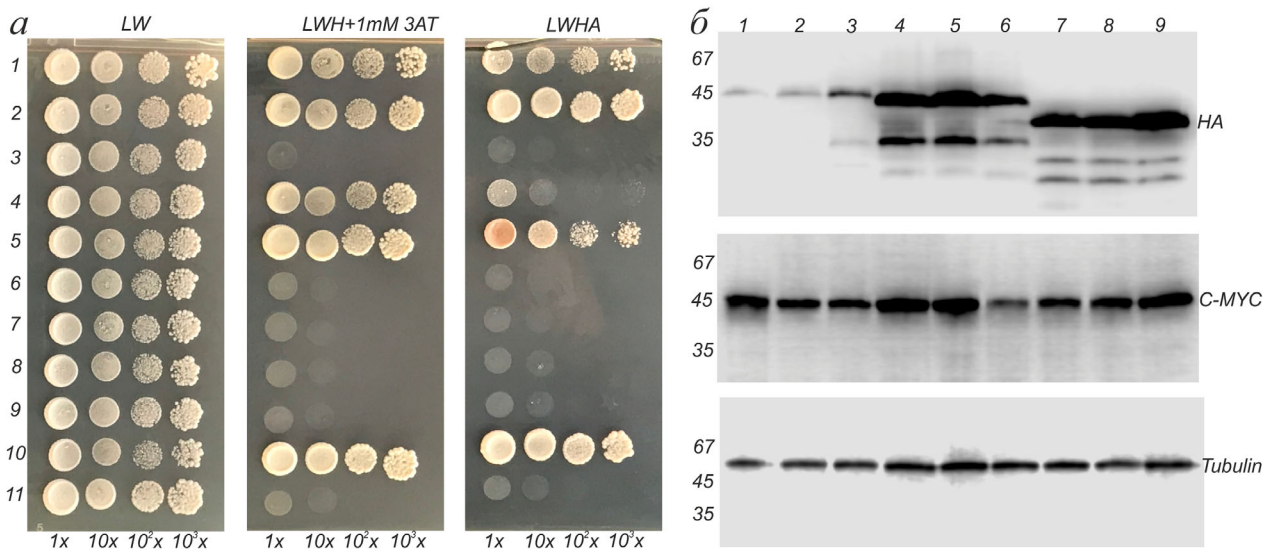


Рис. 3. Анализ взаимодействия белков eIF4E картофеля и VPg вируса Y штамма NTN. *a* – Анализ взаимодействия белков eIF4E картофеля и VPg PVY с помощью дрожжевой двугибридной системы. LW – среда без лейцина и триптофана. LWH + 1мМ 3АТ – среда без лейцина, триптофана и гистидина, с добавлением 1 мМ 3-амино-1,2,4-триазола, подавляющего автоактивацию репортерного гена *HIS3*. LWHА – среда без лейцина, триптофана, аденина и гистидина. 1 – eIF4E1 + VPg-base, 2 – eIF4E1 + VPg-S101G, 3 – eIF4E1 + VPg-R104K, 4 – eIF4E2 + VPg-base, 5 – eIF4E2 + VPg-S101G, 6 – eIF4E2 + VPg-R104K, 7 – eIF(iso)4E + VPg-base, 8 – eIF(iso)4E + VPg-S101G, 9 – eIF(iso)4E + VPg-R104K, 10 – положительный контроль (eIF4E1 *N. tabacum* + VPg-base), 11 – отрицательный контроль (пустые плазмиды pGADT7 и pGBKT7). *b* – Детекция в дрожжах белков eIF4E картофеля с помощью эпитопа HA и белка VPg с помощью эпитопа С-МУС. Образцы 1–9 соответствуют обозначению на панели (*a*). *в* – Количественный анализ взаимодействия белков eIF4E картофеля и VPg PVY с помощью оценки активности β-галактозидазы в дрожжевых клетках. Каждый образец анализировался в четырёх повторах. 1 – положительный контроль (eIF4E1 *N. tabacum* + VPg-base), среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 110,91 ое; 2 – eIF4E1 + S101G, среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 139,32 ое; 3 – eIF4E2 + S101G, среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 213,47 ое; 4 – eIF4E1 + VPg-base, среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 59,51 ое; 5 – eIF4E2 + VPg-base, среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 174,2 ое; 6 – отрицательный контроль (пустые плазмиды pGADT7 и pGBKT7), среднее стандартное отклонение значений люминесценции – 19,22 ое

Анализ взаимодействия факторов eIF4E картофеля с белком VPg-NTN. Из базы данных NCBI была собрана выборка из 828 последовательностей белка VPg, 480 из которых были извлечены из полных геномов вирусов PVY. Примерно половина выборки – 418 вариантов – относится к VPg штамма NTN, который считается наиболее распространённым и вредоносным. Вариант VPg-NTN, наиболее часто встречающийся в выборке из 418 вариантов (более 50%), был принят как базовый, остальные, отличающиеся единичными аминокислотными заменами, были названы мутантными.

Анализ взаимодействия с базовым вариантом VPg штамма NTN показал, что в условиях дрожжевой двугибридной системы с ним взаимодействуют eIF4E1 и eIF4E2, но не eIF(iso)4E (рис. 3, а). Причём первый фактор (eIF4E1) взаимодействует лучше второго (eIF4E2), так как рост дрожжей наблюдается не только на среде с низкой степенью селективности – LWH, но и на среде с высокой селективностью – LWHА. Вестерн-анализ показал, что в клетках дрожжей при сравнительно одинаковом количестве белка VPg белка eIF4E1 существенно меньше, чем eIF4E2 и eIF(iso)4E (рис. 3, б). Возможно, по каким-то причинам белок eIF4E1 картофеля менее стабилен в клетках дрожжей. Однако, несмотря на меньшее количество eIF4E1, он взаимодействует лучше, что было подтверждено путём количественной оценки взаимодействия eIF4E1 и eIF4E2 с базовым вариантом VPg (рис. 3, в).

Вовлечённость двух изоформ eIF4E картофеля во взаимодействие с VPg PVY, показанная в данной работе, совпадает с аналогичными данными, полученными на томате, для которого методом интерференции [12] и с использованием нокаут-мутантов по генам eIF4E1 и eIF4E2 [13, 44] показано участие двух изоформ eIF4E в распространении PVY. Для некоторых других потивирусов также показана способность использовать несколько изоформ факторов eIF4E. Например, потивирус PVMV (Pepper veinal mottle virus) использует eIF4E1 и eIF(iso)4E для заражения перца, а eIF4E2 – для заражения томата [4, 45].

Конструирование модели комплекса eIF4E–VPg. Экспериментальная структурная информация о факторе инициации трансляции из картофеля в настоящее время отсутствует, но по аминокислотной последовательности он близок к факторам инициации трансляции из дыни и пшеницы, для которых такая информация доступна. Подробное описание построения модели фактора eIF4E из картофеля дано в разделе «Материалы и методы». Анализ полученных данных показывает, что, подобно структурам eIF4E из

дыни и пшеницы, фактор инициации из картофеля может быть в двух состояниях: открытом и закрытом, в зависимости от конформации петли $\beta 1$ – $\beta 2$ (рис. 1).

Структура VPg вируса картофеля Y определена методом ЯМР два года назад [25]. Ранее в ряде работ [25–29] было показано, что для узнавания и связывания eIF4E вирус использует механизм, аналогичный механизму, используемому при взаимодействии eIF4E с кэпом. Поэтому имеет смысл подробно рассмотреть структуру интерфейса eIF4E–кэп в соответствующем комплексе из дыни. На поверхности структуры eIF4E имеется глубокая впадина, образованная петлями $\beta 1$ – $\beta 2$, $\beta 3$ – $\beta 4$, $\beta 7$ – $\beta 8$ и торцевой частью β -листа (рис. 1). Во всех известных структурах фактора кэп мРНК размещается между вершинами петель $\beta 1$ – $\beta 2$, $\beta 3$ – $\beta 4$, $\beta 7$ – $\beta 8$. Фосфатный хвост кэпа направлен в сторону торца β -листа. Для узнавания eIF4E пуриновым основанием кэпа используются, по-видимому, рядом расположенные W128 и E129 (номенклатура eIF4E2 из дыни). Эти два остатка отвечают за стекинг-взаимодействие и формирование двух водородных связей межмолекулярного интерфейса. Оба остатка принадлежат петле $\beta 3$ – $\beta 4$, которая сохраняет свою конформацию во всех известных структурах, где на неё не оказывается дополнительного внешнего воздействия за счёт кристаллических контактов, как, например, происходит в случае структуры 5me5. Две другие петли, формирующие впадину, лабильны. В структурах eIF4E из дыни петля $\beta 1$ – $\beta 2$ либо отсутствует, либо отвернута в сторону. В последнем случае строго консервативный W82 направлен в растворитель, тогда как в других кэп-содержащих структурах (2idv, 3am7) он осуществляет стекинг-взаимодействие с основанием кэпа с другой стороны от W128, а петля $\beta 1$ – $\beta 2$ прикрывает кэп. Наложение модели eIF4E2 из картофеля на модель фактора из пшеницы показывает, что координаты остатков 53 и 73 и остатков 47 и 68 соответствующих факторов практически совпадают. Области 53–73 и 47–68 по последовательности идентичны на 76,2%. Это позволяет использовать данную область из структуры 2idv для построения закрытой конформации eIF4E2 картофеля. В этой модели, как и в кэп-содержащих структурах из других организмов, основание кэпа находится между триптофанами 114 и 68, а его атомы N1 и N2 образуют водородные связи с OE1 и OE2 E115. Кроме того, K64, R164 и K169 формируют H-связи с кислородами фосфатной части кэпа. Таким образом, лабильная петля $\beta 1$ – $\beta 2$ закрывает и стабилизирует кэп на поверхности eIF4E.

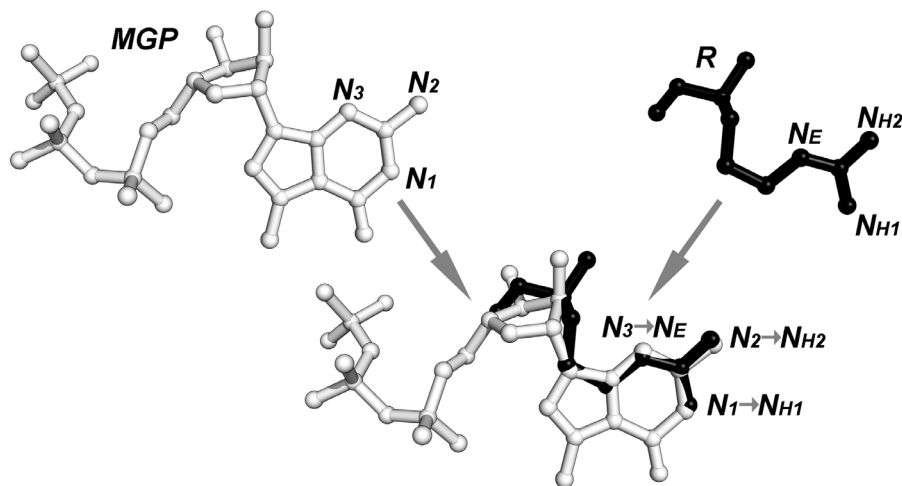


Рис. 4. Наложение 7-метил-гуанозин-5'-трифосфата (PDB ID: 5ABX) (аналог кэп структуры) на аминокислотный остаток аргинина. Боковая цепь аргинина может принять конформацию, повторяющую очертания гуанинового основания 7-метил-гуанозин-5'-трифосфата и позволяющую совместить положения узнающих атомов N1 и N2 аналога кэп и NH1 и NH2 атомов аргинина

Из всех аминокислотных остатков структуру кэпа лучше всего может имитировать аргинин (рис. 4). Этот остаток способен обеспечить стекинг-взаимодействие с триптофаном и две водородные связи с глутаминовой кислотой, подобно тому, как это делает кэп. Фрагмент VPg (88–120 а.о.), который связывается с eIF4E2 [26], содержит аргинин в положениях 94, 99 и 104. На основании данных модели комплекса VPg PVY с фактором eIF4E человека нами было сделано предположение, что роль аналога кэп-структуры играет аргинин VPg в положении 94. Поскольку остаток аргинина, имитирующий кэп, имеет ключевое значение для взаимодействия eIF4E с VPg, этот остаток должен быть строго консервативным. Однако анализ природного разнообразия последовательностей VPg PVY разных штаммов (всего 828 последовательностей) показал, что в существенной доле образцов (4,1%) на месте R94 находится G. Любопытно, что R99 был существенно более консервативен, но тем не менее встречалось несколько последовательностей с заменами в этой позиции. Тогда как R104 был строго консервативен во всех VPg разных штаммов PVY.

Для того чтобы исследовать, насколько присутствие остатка аргинина в положении 104 необходимо для связывания VPg с eIF4E картофеля, был получен вариант VPg, в котором R104 был заменён на лизин. Лизин обладает схожими химическими свойствами, однако со структурной точки зрения не может успешно выполнять функцию аналога кэпа. С помощью дрожжевого двугибридного анализа было установлено, что

мутантная форма VPg с заменой R104K полностью теряла способность взаимодействовать с обоими изоформами eIF4E1 и eIF4E2 картофеля (рис. 3, а). Аналогичный эффект наблюдался при замене аргинина 104 на треонин, глутаминовую кислоту и метионин (рис. S4 в Приложении).

Исходя из всех полученных нами данных, мы предположили, что R104 играет ту же роль в комплексе eIF4E–VPg, что и кэп в комплексе eIF4E–кэп. В стартовой модели VPg остаток R104 был ориентирован относительно eIF4E таким образом, чтобы его боковая цепь лежала в плоскости основания кэпа, а положения атомов NH1, NH2 и NE были близки к положению атомов N1, N2 и N3 кэпа, что позволяет аргинину сформировать две межмолекулярные водородные связи, имеющиеся в комплексах eIF4E–кэп. Стартовая модель eIF4E–VPg содержит eIF4E2 в открытой конформации и VPg, длинная спираль которого имеет направление PA–PB в структуре кэпа. Построенная структура комплекса уточнена методами молекулярной динамики во временном интервале 200 нс.

Комплекс eIF4E–VPg после MD симуляции и уточнения. Описание модели. Модель комплекса eIF4E2–VPg показана на рис. 5. Структура eIF4E из картофеля в целом близка к структуре этого фактора из дыни. Наложение друг на друга β -листов обеих структур даёт среднее квадратичное отклонение 0,97 Å для 54 C α -атомов. Значительные смещения отмечены в петлях β 4–

$\beta 2$, $\beta 7$ - $\beta 8$ и $\beta 1$ - $\beta 2$, причём последняя приобрела конформацию, соответствующую закрытому состоянию фактора eIF4E. Существенно большие изменения претерпела структура VPg, которая стала более компактной. В ней сохранился только β -лист, спирали $\alpha 1$ и $\alpha 2$ сблизилась и образовали шпильку, которой VPg внедрился во впадину на поверхности eIF4E.

Межмолекулярный интерфейс включает область 95–122 и остатки 145 и 148 петли $\beta 3$ - $\beta 4$ VPg. Он содержит 13 водородных связей (таблица), в том числе связи R104 NH1–E115 OE1 и R104 NH2–E115 OE2, которые вместе со стекингом боковых цепей R104 VPg и W114 eIF4E (нумерация по eIF4E2 картофеля) обеспечивают узнавание фактора вирусом. Следует отметить, что строго консервативный W68 eIF4E в структурах, содержащих кэп, участвует в стекинг-взаимодействии с последним, формируя закрытое состояние фактора eIF4E. В модели комплекса eIF4E–VPg из картофеля он участвует в стекинг-взаимодействии с R99 VPg, что также приводит к закрытому состоянию eIF4E.

Влияние замены S101G на взаимодействие eIF4E и VPg в дрожжевой двугибридной системе. Значительная часть природных мутаций VPg располагается в регионе белка, участвующем во взаимодействии с eIF4E. Таким образом, аминокислотные замены в этой области могут влиять на это взаимодействие, усиливая или ослабляя его. Особый интерес представляют мутации, приводящие к преодолению устойчивости у разных растений («resistance-breaking» мутации). Анализ нашей модели показал, что замена S101G может приводить к усилению взаимодействия с eIF4E1 и eIF4E2 картофеля, поскольку исключает Н-связь R104–S101, затрудняющую узнавание фактора инициации трансляции. Выполненный нами анализ взаимодействия в дрожжевой двугибридной системе показал (рис. 3, а), что замена S101G в VPg действительно усиливает его взаимодействие с eIF4E1 и eIF4E2 картофеля. Этот эффект особенно хорошо заметен при количественной оценке их взаимодействия (рис. 3, в, сравните кривые 2 и 4, 3 и 5). Тем не менее такой вариант VPg по-прежнему

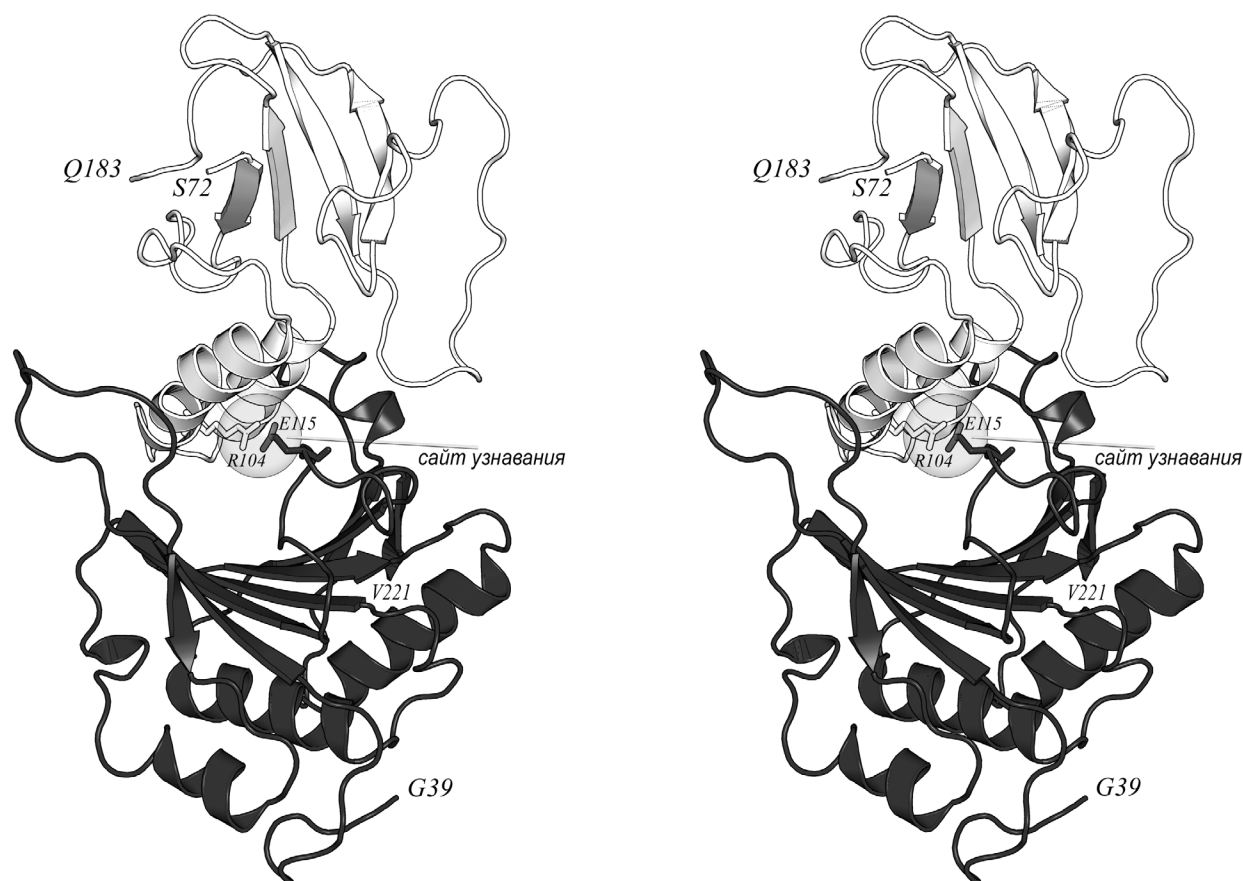


Рис. 5. Стереорепрезентация модели комплекса eIF4E–VPg. Темным цветом показан eIF4E, светлым – VPg. Сайт узнавания отмечен прозрачной сферой

Водородные связи между VPg и eIF4E в комплексе eIF4E–VPg

VPg		eIF4E		Расстояние, Å
Остаток	Атом	Атом	Остаток	
E98	OE2	N	S70	2,84
R104	NH1	OE1	E115	3,07
R104	NH2	OE2	E115	2,57
K105	NZ	OD2	D102	2,41
D111	OD1	NH1	R164	2,62
D111	OD2	NH2	R164	2,80
D111	OD2	NZ	K169	3,01
E112	OE1	NH2	R213	2,64
E114	OE1	NZ	K169	2,72
E114	OE2	NZ	K169	3,15
N145	OD1	NZ	K209	2,77
K148	NZ	OD1	D206	3,04
K148	NZ	OD2	D206	2,82

нему не взаимодействовал с eIF(iso)4E (рис. 3, а). Исходя из анализа полученной нами методом гомологичного моделирования модели eIF(iso)4E (данные не приведены), последний факт можно объяснить за счёт сужения контактной полости eIF(iso)4E в результате изменения его поверхности в области шпильки $\beta 7$ - $\beta 8$, что, в свою очередь, может препятствовать правильному позиционированию в ней узнающей шпильки $\alpha 1$ - $\alpha 2$ VPg. Однако уточнения этой модели ещё не проводилось, ввиду чего данный вопрос требует дальнейших комплексных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы показали, что eIF4E1 и eIF4E2 картофеля взаимодействуют с VPg PVY штамма NTN, а eIF(iso)4E – не взаимодействует. Кроме того, на основании взаимодополняющих подходов – анализа природного полиморфизма целевых белков, экспериментального анализа белок-белкового взаимодействия и молекулярного моделирования – нам впервые удалось построить модель комплекса фактора инициации трансляции eIF4E2 картофеля и вирусного белка VPg. Полученная модель не только хорошо объяснила со структурной точки зрения

полученные биохимические данные, но и позволила достоверно предсказать эффект замены одного из остатков узнающего модуля. Это говорит о том, что данная модель достаточно близка к истинной структуре комплекса и может быть использована для поиска аминокислотных замен в последовательности фактора eIF4E2 картофеля, которые будут препятствовать его взаимодействию с различными формами VPg PVY.

Финансирование. Исследование было выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-29-08024 офи_м). Вестерн-анализ был выполнен в рамках госзадания (№ государственной регистрации АААА-А19-119092390041-5).

Благодарности. Авторы благодарят Козлова Д.Г., зав. лаб. НИЦ «Курчатовский институт», и Губайдуллина И.И., сотрудника НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Курчатовский геномный центр, за ценные консультации по культивированию дрожжей. Авторы благодарят Dr. J.-L. Gallois (INRA) за предоставление дрожжей штамма Jo55 для эксперимента по комплементации. Работа выполнялась с использованием оборудования ЦКП «Биотехнология» ВНИИСБ (Москва, Россия; договор RFMEFI62114×0003).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 9, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Scholthof, K.-B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., et al. (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology, *Mol. Plant Pathol.*, **12**, 938-954, doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00752.X.
- Quenouille J., Vassilakos, N., and Moury, B. (2013) Potato virus Y: a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity, *Mol. Plant Pathol.*, **14**, 439-452, doi: 10.1111/mpp.12024.
- Robaglia, C., and Caranta, C. (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection, *Trends Plant Sci.*, **11**, 40-45, doi: 10.1016/j.tplants.2005.11.004.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., et al. (2002) A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E), *Plant J.*, **32**, 1067-1075, doi: 10.1046/j.1365-313x.2002.01499.x.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J. L., Robaglia, C., Moury, B., et al. (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg, *Plant J.*, **54**, 56-68, doi: 10.1111/j.1365-313x.2008.03407.x.
- Lebaron, C., Rosado, A., Sauvage, C., Gauffier, C., German-Retana, S., et al. (2016) A new eIF4E1 allele characterized by RNAseq data mining is associated with resistance to PVY in tomato albeit with a low durability, *J. Gen. Virol.*, **97**, 3063-3072.
- Rubio, M., Nicolai, M., Caranta, C., and Palloix, A. (2009) Allele mining in the pepper gene pool provided new complementation effects between pvr2-eIF4E alleles and pvr6-eIF (iso) 4E for resistance to the Pepper veinal mottle virus, *J. Gen. Virol.*, **90**, 2808-2814, doi: 10.1099/vir.0.013151-0.
- Julio, E., Cotucheau, J., Decorps, C., Volpatti, R., Sentenac, C., et al. (2015) A eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the "va" tobacco recessive resistance to potyviruses, *Plant Mol. Biol. Report.*, **33**, 609-623, doi: 10.1007/s11105-014-0775-4.
- Cavatorta, J., Perez, K. W., Gray, S. M., Van Eck, J., Yeam, I., and Jahn, M. (2011) Engineering virus resistance using a modified potato gene, *Plant Biotechnol. J.*, **9**, 1014-1021.
- Gutierrez Sanchez, P., Babujee, L., Mesa, H. J., Arcibal, E., Gannon, M., et al. (2020) Overexpression of a modified eIF4E regulates potato virus Y resistance at the transcriptional level in potato, *BMC Genomics*, **21**, doi: 10.1186/s12864-019-6423-5.
- Poulicard, N., Pacios, L. F., Gallois, J. L., Piñero, D., and García-Arenal, F. (2016) Human management of a wild plant modulates the evolutionary dynamics of a gene determining recessive resistance to virus infection, *PLoS Genet.*, **12**, doi: 10.1371/journal.pgen.1006214.
- Mazier, M., Flamain, F., Nicolai, M., Sarnette, V., and Caranta, C. (2011) Knock-down of both eIF4E1 and eIF4E2 genes confers broad-spectrum resistance against potyviruses in tomato, *PLoS One*, **6**, doi: 10.1371/journal.pone.0029595.
- Gauffier, C., Lebaron, C., Moretti, A., Constant, C., Moquet, F., et al. (2016) A TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato is hampered by eIF4E gene redundancy, *Plant J.*, **85**, 717-729, doi: 10.1111/tj.13136.
- Michel, V., Julio, E., Candresse, T., Cotucheau, J., Decorps, C., et al. (2019) A complex eIF4E locus impacts the durability of va resistance to *Potato virus Y* in tobacco, *Mol. Plant Pathol.*, **20**, 1051-1066, doi: 10.1111/mpp.12810.
- Masuta, C., Nishimura, M., Morishita, H., and Hataya, T. (1999) A single amino acid change in viral genome-associated protein of potato virus Y Correlates with resistance breaking in 'virgin a mutant' tobacco, *Phytopathology*, **89**, 118-123, doi: 10.1094/PHYTO.1999.89.2.118.
- Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A., and Moury, B. (2007) Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the pvr2 resistance allelic series in pepper, *J. Gen. Virol.*, **88**, 1594-1601, doi: 10.1099/vir.0.82702-0.
- Takakura, Y., Udagawa, H., Shinjo, A., and Koga, K. (2018) Mutation of a *Nicotiana tabacum* L. eukaryotic translation-initiation factor gene reduces susceptibility to a resistance-breaking strain of Potato virus Y, *Mol. Plant Pathol.*, **19**, 2124-2133, doi: 10.1111/mpp.12686.
- Baebler, S., Coll, A., and Gruden, K. (2020) Plant molecular responses to potato virus Y: a continuum of outcomes from sensitivity and tolerance to resistance, *Viruses*, **12**, 217, doi: 10.3390/v12020217.
- Duan, H., Richael, C., and Rommens, C. (2012) Overexpression of the wild potato eIF4E-1 variant Eval elicits Potato virus Y resistance in plants silenced for native eIF4E-1, *Transgenic Res.*, **21**, 929-938, doi: 10.1007/s11248-011-9576-9.
- Zhang, C., Zarka, K., Zarka, D., Whitworth, J., and Douches, D. (2021) Expression of the tomato pot-1 gene confers potato virus Y (PVY) resistance in susceptible potato varieties, *Am. J. Potato Res.*, **98**, 42-50, doi: 10.1007/s12230-020-09815-y.
- Cavatorta, J. R., Savage, A. E., Yeam, I., Gray, S. M., and Jahn, M. (2008) Positive Darwinian selection at single

- amino acid sites conferring plant virus resistance, *J. Mol. Evol.*, **67**, 551-559, doi: 10.1007/s00239-008-9172-7.
22. Wang, A., and Krishnaswamy, S. (2012) Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement, *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 795-803, doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x.
 23. Grzela, R., Szolajska, E., Ebel, C., Madern, D., Favier, A., et al. (2008) Virulence Factor of potato virus Y, genome-attached terminal protein VPg, is a highly disordered protein, *J. Biol. Chem.*, **283**, 213-221, doi: 10.1074/jbc.M705666200.
 24. Moury, B., Charron, C., Janzac, B., Simon, V., Gallois, J. L., et al. (2014) Evolution of plant eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and potyvirusgenome-linked protein (VPg): a game of mirrors impacting resistance spectrum and durability, *Infect. Genet. Evol.*, **27**, 472-480, doi: 10.1016/j.meegid.2013.11.024.
 25. De Oliveira, L., Volpon, L., Rahardjo, A. K., Osborne, M. J., Culjkovic-Kraljacic, B., et al. (2019) Structural studies of the eIF4E-VPg complex reveal a direct competition for capped RNA: implications for translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 24056-24065, doi: 10.1073/pnas.1904752116.
 26. Walter, J., Barra, A., Charon, J., Tavert-Roudet, G., and Michon, T. (2020) Spectroscopic investigation of the kinetic mechanism involved in the association of potyviral VPg with the host plant translation initiation factor eIF4E, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5618-5633, doi: 10.3390/ijms21165618.
 27. Leonard, S. P., D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberte, J. F. (2000) Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity, *J. Virol.*, **74**, 7730-7737, doi: 10.1128/jvi.74.17.7730-7737.2000.
 28. Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., et al. (2007) Different mutations in the genome-linked protein VPg of potato virus Y confer virulence on the pvr2-3 resistance in pepper, *Mol. Plant Microbe Interact.*, **19**, 557-563, doi: 10.1094/MPMI-19-0557.
 29. Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E., and Le Gall, O. (2007) Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro, *J. Gen. Virol.*, **88**, 1029-1033, doi: 10.1099/vir.0.82501-0.
 30. Okonechnikov, K., Golosova, O., and Fursov, M. (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit, *Bioinformatics*, **28**, 1166-1167, doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
 31. Hughes, J. M., Ptushkina, M., Karim, M. M., Koloteva, N., von der Haar, T., and McCarthy, J. E. (1999) Translational repression by human 4E-BP1 in yeast specifically requires human eIF4E as target, *J. Biol. Chem.*, **274**, 3261-3264, doi: 10.1074/jbc.274.6.3261.
 32. Gietz, R., Schiestl, R. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method, *Nat. Protoc.*, **2**, 31-34, doi: 10.1038/nprot.2007.13.
 33. Aho, S., Arffman, A., Pummi, T., and Uitto, J. (1997) A novel reporter gene *MEL1* for the yeast two-hybrid system, *Anal. Biochem.*, **253**, 270-272, doi: 10.1006/abio.1997.2394.
 34. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
 35. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., et al. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 296-303, doi: 10.1093/nar/gky427.
 36. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W., and Cowtan, K. (2010) Features and development of coot, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 486-501, doi: 10.1107/S0907444910007493.
 37. Krissinel, E., and Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2256-2268, doi: 10.1107/S0907444904026460.
 38. Miras, M., Truniger, V., Silva, C., Verdaguier, N., Aranda, M. A., and Querol-Audi, J. (2017) Structure of eIF4E in complex with an eIF4G peptide supports a Universal bipartite binding mode for protein translation, *Plant Physiol.*, **174**, 1476-1491, doi: 10.1104/pp.17.00193.
 39. Monzingo, A. F., Dhaliwal, S., Dutt-Chaudhuri, A., Lyon, A., Sadow, J. H., et al. (2007) The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond, *Plant Physiol.*, **143**, 1504-1518, doi: 10.1104/pp.106.093146.
 40. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008) GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.*, **4**, 435-447, doi: 10.1021/ct700301q.
 41. MacKerell, A. D. Jr., Feig, M., and Brooks, C. L. (2004) Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1400-1415, doi: 10.1002/jcc.20065.
 42. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M., Darden, T., Lee, H., and Pedersen, L. (1995) A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Physics*, **103**, 8577, doi: 10.1063/1.470117.
 43. Altmann, M., Sonenberg, N., and Trachsel, H. (1989) Translation in *Saccharomyces cerevisiae*: initiation factor 4E-dependent cell-free system, *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 4467-4472, doi: 10.1128/mcb.9.10.4467.
 44. Piron, F., Nicolaï, M., Minoia, S., Piednoir, E., Moretti, A., et al. (2010) An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses, *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0011313.
 45. Moury, B., Lebaron, C., Szadkowski, M., Khalifa, M. B., Girardot, G., et al. (2020) Knock-out mutation of eukaryotic initiation factor 4E2 (eIF4E2) confers resistance to pepper vein mottle virus in tomato, *Virology*, **539**, 11-17, doi: 10.1016/j.virol.2019.09.015.

**VPg OF PVY AND POTATO CAP-BINDING eIF4E FACTORS:
SELECTIVE INTERACTION AND ITS SUPPOSED MECHANISM**

**M. V. Lebedeva^{1*}, E. Y. Nikonova², A. A. Terentiev^{3,4,5},
V. V. Taranov¹, A. V. Babakov¹, and O. S. Nikonov²**

¹ *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russian Academy of Sciences,
127550 Moscow, Russia; E-mail: marilistik@mail.ru*

² *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

³ *Institute of Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences,
142432 Chernogolovka, Moscow Region, Russia*

⁴ *Scientific and Educational Center in Chernogolovka of Moscow Region State University,
141014 Mytishchi, Moscow Region, Russia*

⁵ *Faculty of Fundamental Physical and Chemical Engineering, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia*

Potato virus Y (PVY) is one of the most distributed and harmful plant viruses. Translation of viral RNA starts with interaction between the plant cap-binding translation initiation factors eIF4E and covalently bound to the viral RNA viral protein VPg. One of the natural mechanisms of host plant resistance to PVY is based on this interaction disrupting. Potato (*Solanum tuberosum* L.) eIF4E multigene family contains genes of 3 translation initiation factors – *eIF4E1*, *eIF4E2* и *eIF(iso)4E*. However, until now, it was unknown, which factors can be recruited by PVY and how this happens exactly. In this study we have shown that the most common VPg of PVY-NTN strain interacts with potato eIF4E1 and eIF4E2 proteins, but doesn't interact with eIF(iso)4E. The models of potato eIF4E1 and eIF4E2 and PVY VPg were constructed. Using data from the natural VPg amino acid polymorphism and constructed models, we proposed, that R104 plays a key role in recognition of potato cap-binding factors. In order to check it, we created mutant forms of VPg protein with substitutions in position 104 and examined their ability to interact with potato eIF4E factors. As a result, theoretical model of VPg-eIF4E2 complex was build. Suggested model significantly differs from already known models of complexes of potyvirus VPg with eIF4E and is in good agreement with current biochemical data.

Keywords: eIF4E, potato virus Y, VPg, translation initiation